



TITLE:

ゲノムストレスに対する細胞応答機構の解明(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

河村, 香寿美

CITATION:

河村, 香寿美. ゲノムストレスに対する細胞応答機構の解明. 京都大学, 2019, 博士(人間・環境学)

ISSUE DATE:

2019-03-25

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k21874>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開

京都大学	博士（ 人間・環境学 ）	氏名	河村 香寿美
論文題目	ゲノムストレスに対する細胞応答機構の解明		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>ゲノムDNAには、内因性・外因性の環境刺激（ゲノムストレス）によりさまざまな損傷が絶えず引き起こされている。それらのなかでもDNA二本鎖切断（DSB）損傷は、細胞死やがん化につながる非常に重篤な損傷である。DSB損傷は、電離放射線の曝露によって誘発されることが知られているが、DNA複製が阻害された状況（複製ストレス）においても二次的に引き起こされることが知られている。本研究では、ゲノム情報を安定に維持するうえでの脅威となっている複製ストレスに注目して、それに対抗する細胞応答機構において重要な因子であるMRE11やヌクレオリンの機能解明を試みたものである。</p> <p>第1章では、ゲノムストレスにより生じるDNA損傷の種類を概説したうえで、放射線誘発DSB損傷を例に、細胞にはDSB損傷に対抗するための機構として、細胞周期チェックポイント機構および二つの主要なDSB修復機構（非相同末端再結合、相同組換え）が備わること、細胞周期チェックポイント制御にはDSB損傷応答における主要な制御タンパク質であるATMキナーゼが機能し、そのキナーゼ活性がMRE11/NBS1/RAD50複合体によって制御されることが述べられている。また、複製ストレスによる二次的DSB損傷においても、ATMキナーゼに類似したタンパク質であるATRキナーゼによって細胞周期チェックポイントが活性化され相同組換え機構によって修復される際に、MRE11が活性の制御に寄与している可能性が述べられている。そのうえで、MRE11や核小体に局在しDSB損傷応答における機能が報告されているタンパク質ヌクレオリンに着目して、ゲノムストレスに対する細胞応答機構を解明する必要性について述べている。</p> <p>第2章では、MRE11タンパク質の47番目のアラニン（A47）の変異を手がかりに、A47の重要性ならびにMRE11の機能を明らかにしている。MRE11は出芽酵母からヒトまで真核生物に広く保存されているタンパク質であり、本研究で着目するこのタンパク質のA47はすべての生物種において保存されている。一方で、毛細血管拡張性運動失調症類似疾患として近年発見された日本人患者では、A47がバリンに変異しており疾患の原因の一つと考えられている。本章では、変異したMRE11と変異していないMRE11をそれぞれもつ細胞におけるMRE11の各種活性を比較し、変異によってもたらされる変化からA47の重要性ならびにMRE11の機能を考察している。変異したMRE11は、NBS1、RAD50との複合体形成に異常があること、変異していないMRE11が核に局在するのに対して、変異したMRE11が細胞質に局在することを示し、変異によるNBS1との結合異常が細胞質局在の原因となっていることを指摘した。また、変異したMRE11もつ細胞では、ATM及びATRのキナーゼ活性が低下すること、カンプトテシン処理によって複製ストレスを誘導した際、相同組換え修復の初期応答因子であるRAD51及びRAP80の損傷部位への局在が低下すること、さらに、その前段階に起こる一本鎖DNA末端の形成頻度が低下することを示し、相同組換え修復の初期</p>			

制御に異常がある可能性を指摘した。以上の結果から、MRE11のA47はMRE11が核に局在するためには変異が許容されないアミノ酸であり、その変異がATM/ATRキナーゼの機能、ひいては細胞周期チェックポイント機構、DSB修復機構の機能欠損の要因であると結論した。

第3章では、核小体に局在するタンパク質ヌクレオリンに着目し、複製ストレス応答におけるヌクレオリンの機能の解明を試みている。最初に、ゲノムDNA上に存在する反復配列が複製ストレスの要因になりうることから、多コピーの反復配列を有するリボソームDNAが局在する核小体内では、複製ストレスが多発している可能性を指摘している。このため核小体を構成するタンパク質のなかには複製ストレスに対抗するための機能をもつ可能性があると考え、DSB損傷応答への関与が示唆されているヌクレオリンに着目した理由を述べている。免疫沈降法による解析から、ヌクレオリンが、カンプトテシン処理による複製ストレスの増加に伴って、DSB損傷部位に局在することが知られるヒストンタンパク質 γ H2AXや、DNA複製・修復に関わるタンパク質PCNAと結合することを示し、ヌクレオリンが損傷複製フォーク上でこれらタンパク質と相互作用する可能性を示した。さらに、特異的siRNAを用いてヌクレオリンの発現を抑制した細胞をカンプトテシン処理によって複製ストレスを与えた場合、ATRキナーゼ活性の上昇が抑制されること、RAD51、RPA32の損傷部位への局在がともに低下することを明らかにした。これらの結果により、ヌクレオリンがATRキナーゼ活性に依存した細胞周期チェックポイント機構および相同組換え修復機構に関与する可能性を示唆した。さらに、ヌクレオリンを過剰に発現させた細胞を用いてカンプトテシン処理による複製ストレス細胞応答への影響を調べたところ、ATRキナーゼ活性に依存したリン酸化や、相同組換えに必要なタンパク質等のクロマチンへの集積が増強される結果を得ている。これらの結果に基づき、これまでしばしば報告されてきたがん細胞におけるヌクレオリンの高発現とがん化の関連について、ヌクレオリンの高発現による複製ストレスに対する細胞応答の亢進が、がんの悪性化に寄与していることを提唱した。

第4章では、第2章、第3章で明らかにしたゲノムストレスに対する細胞応答機構におけるMRE11及びヌクレオリンの役割をまとめ、これら因子の機能のさらなる解明は複製ストレス応答の全容解明に重要であるとともに、これらを標的としたがん治療にも貢献しうると説明している。

(論文審査の結果の要旨)

ゲノムDNAに引き起こされる最も重篤な損傷は、外因性ストレスの一つ、電離放射線曝露で発生するDNA二本鎖切断 (DSB) であるが、内因性・外因性ストレスはDSB損傷以外にも様々な損傷をゲノムDNAに引き起こす。このようなストレスから生じたDNA損傷は、しばしばDNA複製の進行を阻害して (複製ストレス)、DSB損傷を二次的に引き起こすことが知られる。生物への曝露頻度が高い紫外線や活性酸素種も複製ストレスを頻繁に誘発して、生物がゲノム安定性維持する上での脅威となると考えられる。このため複製ストレスに対抗するための細胞応答機構を解明することは重要な課題である。

本研究では、放射線高感受性遺伝病の原因遺伝子の翻訳産物であるMRE11、主要核小体タンパク質ヌクレオリンに着目し、内因性・外因性の環境刺激 (ゲノムストレス) に対する細胞応答機構の解明が試みられ、MRE11ならびにヌクレオリンのゲノムストレス応答における役割、がん悪性化との関連を見いだしている。このような成果は複製ストレスに対する細胞応答の全容解明の上で、大きな前進となると考えられる。

本学位申請論文では、第1章で内因性・外因性ゲノムストレスによって引き起こされるDNA損傷の種類、複製ストレスの誘発機構、それらに対する細胞応答に関する既報の知見が適切にまとめられ説明されている。

第2章では、減数分裂期の相同組換え制御因子であるMRE11が毛細血管拡張性運動失調症類似疾患における原因遺伝子であり、近年日本人患者で新規変異部位 (47番目のアラニンがバリンに置換) が報告されたことが説明されている。さらに、このアミノ酸は多くの生物種で広く保存されることから、この部位に着目し、ゲノムストレス応答におけるアラニン47の重要性、MRE11の機能解明を試みている。患者由来細胞を用いた免疫沈降法解析から患者で発現する変異型MRE11がNBS1と結合できないことを、免疫蛍光染色法によって変異型MRE11が正常型MRE11とは異なって核へ局在できないことを示し、アラニン47がNBS1との結合やMRE11が核に局在するために置換が許容されないアミノ酸であることを初めて明らかにした。さらに、患者由来細胞では放射線照射および複製ストレス誘発処理時にATM/ATR依存的なリン酸化が顕著に低下していることを示した。複製ストレスで生じるDSB損傷が相同組換え機構で修復される際、修復の初期に関わる2つのタンパク質RPA32およびRAD51の損傷部位への局在が、患者由来細胞で低下していた。さらに、患者由来細胞では、相同組換え修復に必要な一本鎖末端形成も低下することを見いだした。これらの発見から、複製ストレスに伴うATRの活性に依存した細胞周期チェックポイント機構および相同組換え機構の活性化へのMRE11の役割を初めて明らかにした。今回の成果はMRE11の変異を原因とする疾患の分子生物学的解明にとどまらず、この変異を手がかりとしたMRE11の機能解明に新たな視点を加えている点において高く評価できる。本研究の成果は、今後のMRE11機能の全容解明に大きく貢献するものと期待される。

第3章では、核小体は複製ストレスを多発させうる反復配列に富むリボソームDNA

を含むことから、核小体タンパク質には複製ストレスに対抗する機能を持つ可能性が考えられることを指摘した上で、放射線誘発DSB損傷応答で機能することが知られているヌクレオリンに着目し、複製ストレス細胞応答における役割の解明を試みている。免疫沈降法による解析から、ヌクレオリンが複製ストレス誘発にともない、DSB損傷応答因子 γ H2AX、DNA複製制御因子PCNAと結合することを見いだした。siRNAを導入してヌクレオリンの発現を抑制した細胞では、カンプトテシン処理、紫外線曝露による複製ストレス誘発時に、ATRキナーゼの活性上昇が顕著に抑制されること、さらに同様に複製ストレス誘導時のRAD51、RPA32の損傷部位への局在もともに低下することを発見した。これらの結果からヌクレオリンが複製ストレス誘発時に、細胞周期チェックポイントと相同組換え修復の両方の機構を制御する重要因子であることを初めて示した。さらに、ヌクレオリンを過剰発現する細胞を作製して複製ストレス細胞応答を検討した結果、ATRキナーゼおよび相同組換えの活性化がともに亢進しており、がん細胞でしばしば観察されるヌクレオリンの過剰発現は複製ストレス細胞応答を増強してがん悪性化に貢献する可能性を提唱した。このようなヌクレオリンの複製ストレス細胞応答における新たな役割の発見は、リボソーム形成の重要因子であるリボソームDNAの安定性維持機構の解明においても大きく貢献することが期待される。

第4章では、第2章、第3章の結果をまとめ、本研究において明らかにしたMRE11およびヌクレオリンの新たな機能は、複製ストレスに対する細胞が持つ対抗機構の全容およびがん悪性化における複製ストレス応答の役割を解明する上で大きな手がかりとなること、さらにはこれらを分子ターゲットとしたがん治療の発展にも貢献しうることが述べられている。

以上のように、本研究は、ゲノムストレス・複製ストレスに対する細胞応答におけるMRE11およびヌクレオリンの新たな機能、がん悪性化との関係を明らかにし、これら研究成果は環境刺激に対する細胞応答機構に関して、その研究の発展を促進する可能性を有しており、高く評価できる。本研究成果は、相関環境学専攻分子・生命環境論講座の目的の一つである「生物が種々の環境に適応するメカニズムの探求」に貢献するものであり、同講座に相応しい内容を備えた研究であると言える。

よって、本論文は博士（人間・環境学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成31年1月24日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、出版刊行上の支障がなくなるまでの間、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公表可能日： 年 月 日以降